DOI: 10.14188/j.1671-8852.2025.0051

文章编号 1671-8852(2025)12-1583-07

FBXL6通过TNF-α通路促进膀胱癌增殖和迁移

黄若愚[1] 王行环[1,2]

[1]武汉大学中南医院泌尿外科 湖北 武汉 430071；

[2]中国医学科学院武汉传染病与肿瘤研究中心 湖北 武汉 430071

摘要 目的：探讨FBXL6在膀胱癌中的作用，特别是其通过调控肿瘤坏死因子（TNF）-α信号通路对膀胱癌细胞增殖和迁移的影响，评估FBXL6作为膀胱癌潜在预后标志物的价值。方法：首先通过TCGA数据库分析了FBXL6在膀胱癌组织中的表达水平，并与临床预后数据进行了相关性分析。接着，采用小干扰RNA（siRNA）技术在5637细胞和T24细胞中敲低FBXL6表达，通过Western Blot（WB）和qRT-PCR验证其在蛋白质和mRNA水平的抑制效果。进一步通过MTT实验评估细胞增殖能力，并进行Transwell以及Wound healing实验评估细胞迁移能力。最后采用RNA测序（RNA-seq）分析FBXL6下游调控的分子通路，其中TNF-α信号通路最为显著，我们进一步选取其中关键蛋白，通过WB实验加以验证。结果：TCGA数据分析显示，FBXL6在膀胱癌组织中的表达显著高于正常膀胱组织，且其高表达与膀胱癌患者的不良预后密切相关。细胞实验结果表明，敲低FBXL6后，膀胱癌细胞的增殖和迁移能力显著降低，过表达FBXL6则升高。RNA-seq分析进一步揭示，FBXL6通过调控TNF-α信号通路，促进了膀胱癌的发生和进展。结论：本研究证明FBXL6在膀胱癌中的关键作用，特别是在促进细胞增殖和迁移方面。通过调节TNF-α信号通路，FBXL6可能促进膀胱癌的进展，提示FBXL6可能成为膀胱癌的预后标志物及潜在治疗靶点。

关键词 膀胱癌；FBXL6；TNF-α；增殖；迁移；RNA-seq

中图分类号 R69

文献标识码 A

开放科学（资源服务）标识码（OSID）：

FBXL6 regulates bladder cancer cell proliferation and migration via TNF-α signaling pathway

HUANG Ruoyu[1], WANG Xinghuan[1,2]

[1]Department of Urology, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430071, Hubei, China;

[2]Wuhan Research Center for Infectious Diseases and Cancer, Chinese Academy of Medical Sciences, Wuhan 430071, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the role of FBXL6 in bladder cancer(BLCA), focusing on its inference on cell proliferation and migration through regulation of the TNF-α signaling pathway, and evaluate its potential as a prognostic marker for BLCA. **Methods:** FBXL6 expression levels in bladder cancer tissues were analyzed using data from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database and correlated with clinical prognosis. FBXL6 expression was silenced in 5637 and T24 bladder cancer cells using small interfering RNA (siRNA), and knockdown efficiency was confirmed at both protein and mRNA levels.

课题来源：武汉市中青年医学骨干人才培养工程（编号：YL1400000018）

作者简介：黄若愚，男，1999—，医学硕士生，主要从事泌尿系肿瘤等方面的研究，E-mail：844710883@qq.com

通信作者：王行环，男，1965—，教授，主任医师，主要从事泌尿系肿瘤等方面的研究，E-mail：wangxinghuan@whu.edu.cn

Cell proliferation was assessed using the MTT assay, and cell migration was evaluated by Transwell and wound healing assays. RNA sequencing (RNA-seq) was performed to identify molecular pathways regulated by FBXL6, with a focus on TNF-α signaling pathway. **Results:** TCGA analysis revealed that FBXL6 is significantly overexpressed in bladder cancer tissues compared to normal bladder tissues, and its high expression strongly correlates with a poor prognosis in bladder cancer patients. Functional assays demonstrated that FBXL6 silencing significantly inhibited cell proliferation and migration. RNA-seq analysis further indicated that FBXL6 promotes bladder cancer progression by modulating the TNF-α signaling pathway. **Conclusion:** FBXL6 plays a pivotal role in bladder cancer progression by regulating cell proliferation and migration through the TNF-α signaling pathway. These findings suggest that FBXL6 could serve as a potential prognostic marker and therapeutic target for bladder cancer.

Key Words Bladder Cancer; FBXL6; TNF-α; Proliferation; Migration; RNA-seq

膀胱癌(bladder cancer, BLCA)是全球发病率较高的泌尿系统恶性肿瘤之一,其侵袭性强,易复发与转移。尽管现有的手术、化疗和免疫治疗手段不断进步,但晚期膀胱癌患者的预后依然较差,尤其是肿瘤转移和耐药性问题尚未得到有效解决[1]。因此,寻找与膀胱癌发生、发展相关的分子机制以及潜在的靶向治疗策略,仍是当前研究的重点[2]。

FBXL6(F-box and leucine-rich repeat protein 6)是F-box蛋白家族成员之一,参与多种生物学过程,如细胞增殖、迁移和凋亡[3]。近9年来,FBXL6在多种癌症中的作用逐渐受到关注,尤其是在调控细胞周期和肿瘤微环境方面[4]。然而,FBXL6在膀胱癌中的功能和作用机制尚未被充分研究。因此,本研究通过癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas,TCGA)数据库分析FBXL6在膀胱癌中的表达情况,并通过细胞实验进一步验证其在膀胱癌细胞增殖、迁移中的作用。

TCGA数据分析显示,FBXL6在膀胱癌组织中的表达显著高于正常膀胱组织,并且与膀胱癌的分期紧密相关。此外,我们发现高表达的FBXL6与膀胱癌的不良预后密切相关,提示FBXL6可能成为膀胱癌的潜在预后标志物。为了进一步探讨FBXL6在膀胱癌中的作用,本研究通过小干扰RNA(siRNA)敲低FBXL6的表达,并进行了一系列的细胞学实验,包括细胞增殖、迁移实验等和转录组测序,揭示其可能通过调控肿瘤坏死因子(TNF)-α信号通路促进膀胱癌的发生与发展。

1 材料与方法

1.1 细胞培养 人膀胱癌细胞系5637来自中国科学院细胞库。5637和T24使用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基(美国Gibco公司)进行培养。所有细胞均在37 ℃、5%的二氧化碳和95%的空气中孵育培养。

1.2 主要试剂 兔抗人FBXL6(bs-16041R,中国博奥森公司)抗体及鼠抗人GAPDH(sc-365062,美国Santa Cruz公司)抗体。

1.3 UALCAN网站数据分析 通过UALCAN网站(https://ualcan.path.uab.edu/index.html)分析FBXL6在膀胱癌中的表达差异及相关的生存分析。

1.4 GEPIA2网站数据分析 通过GEPIA2网站(http://gepia2.cancer-pku.cn/)绘制FBXL6在膀胱癌中的生存分析曲线[5]。

1.5 5637和T24细胞中的FBXL6敲低 为了敲低FBXL6的表达,采用Lipofectamine™ 3000转染试剂(美国Invitrogen公司)将siRNA(中国吉玛公司)转染到细胞中。对照组使用非靶向siRNA(siNC)。引物(序列)分别为:siFBXL6-1(5′-GCAAGUUGUGGCUGACCUATT-3′);siFBXL6-2(5′-GCAUCAACCGUAAUAGCAUTT-3′);siNC(5′-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3′)。

1.6 MTT实验 将5×10^3细胞接种于96孔板中,分别在24、48、72、96和120 h加入MTT溶液(5 mg·mL^{-1}),继续培养4 h后,弃上清,加入DMSO溶解反应产物,使用酶标仪在570 nm波长下测定光密度(*OD*值)。

1.7 Transwell实验 通过Transwell小室(美国Corning公司)评估细胞迁移能力。转染后,1×10^6个5637细胞以无血清培养基接种于上室,并用含10%FBS的完全培养基填充下室。培养24 h后,使用甲醇固定、结晶紫染色,并在显微镜下计数迁移至下室的细胞。

1.8 蛋白免疫印迹(Western Blot, WB) 细胞在

冰上用含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂（美国 Sigma-Aldrich 公司）的 RIPA 缓冲液裂解半小时。随后，使用超声波破碎仪处理细胞 10 s，并在 14 000 *g* 下离心 10 min，再加入 5× loading buffer 稀释至 1× 后 100 ℃ 10 min。蛋白质含量通过 BCA 法测定。全细胞裂解液通过 SDS-PAGE 电泳分离，然后将蛋白质转移到聚偏二氟乙烯（PVDF）膜上。接着，用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液（10 mmol•L^{-1} Tris-HCl，150 mmol•L^{-1} NaCl 和 2% Tween 20）封闭 PVDF 膜，加入相应的一抗并在 4 ℃孵育过夜。第 2 天，用 TBST 缓冲液洗涤 PVDF 膜 3 次。然后，将 2% 脱脂奶粉与二抗在室温下孵育 1 h，再次用 TBST 缓冲液洗涤 PVDF 膜 3 次。最后，通过化学发光法检测蛋白质，并使用凝胶成像仪（BioSpectrum 515 Imaging System，美国 UVP 公司）成像。

1.9　转录实时定量聚合酶链式反应（qRT-PCR）　我们使用 HiPure Total RNA Mini Kit（R4111-03，中国 Magen 公司）从细胞中提取 RNA。使用 NanoDrop™ One（美国 Thermo Fisher 公司）检测提取 RNA 的质量和浓度。根据 ReverTra Ace qPCR RT Kit（日本 TOYOBO 公司）的操作说明合成 cDNA。qRT-PCR 通过 StepOnePlus™ Real-Time PCR 系统（美国 Thermo Fisher 公司）进行。

1.10　统计学分析　使用 GraphPad Prism 8 软件来评估所有数据的统计学意义。所有数据均以均数±标准差表示。采用单因素方差分析进行统计学分析，$P<0.05$ 被认为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　FBXL6 在膀胱癌中高度表达且与不良预后相关　我们使用 UALCAN 网站对 TCGA 数据库中 FBXL6 在膀胱癌以及正常膀胱组织的数据进行分析，发现 FBXL6 在膀胱癌中的表达高于正常组织（$P<0.001$）（图 1C）。膀胱癌组织中 FBXL6 甲基化水平低于正常膀胱组织，这同样说明肿瘤组织中 FBXL6 的高表达（图 1A）。并发现 FBXL6 的高表达与分期有关，在中晚期中表达更高（$P<0.001$）（图 1B）。我们通过 GEPIA2 分析了 TCGA 的数据并绘制了总生存期（overall survival，OS）曲线，发现高表达的 FBXL6 与预后有紧密联系，高表达 FBXL6 的患者总体生存预后不良（$P<0.001$）（图 1D）。

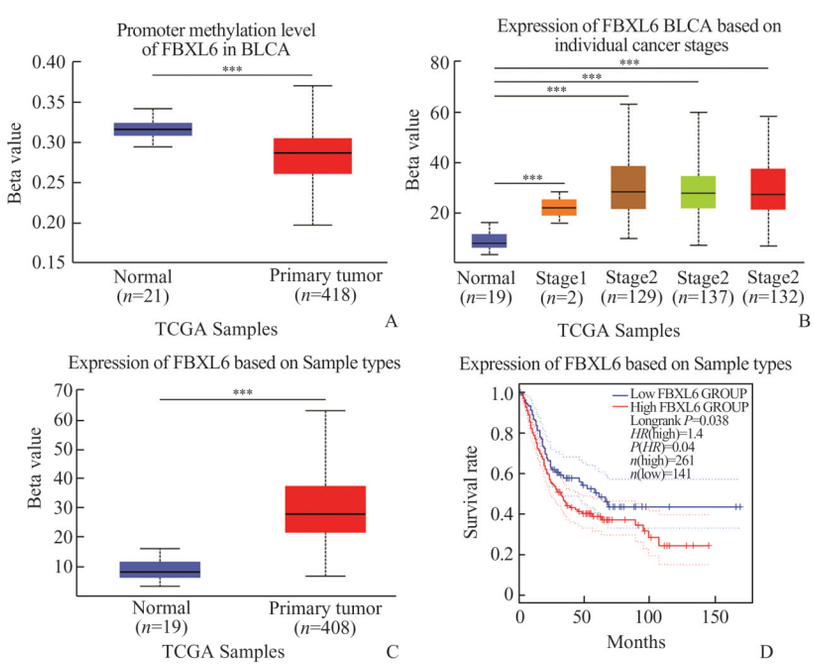


图 1　FBXL6 在膀胱癌中的表达及生存分析

A. 使用 UALCAN 分析 FBXL6 在膀胱癌及正常组织中启动子早基化水平。B. 使用 UALCAN 分析 FBXL6 在膀胱癌不同分期的表达。C. 使用 UALCAN 分析 FBXL6 在膀胱癌及正常组织的表达。D. 使用 GEPIA2 绘制的 FBXL6 在膀胱癌中的生存分析曲线。数据显示为均数±标准差，$^{***}P<0.001$。

2.2　敲低 FBXL6 抑制了膀胱癌细胞的增殖能力　为了进一步探究 FBXL6 在膀胱癌中的生物学功能，我们通过 siRNA 在 5637 膀胱癌细胞中将 FBXL6 敲低，并且通过 WB 和 qRT-PCR 进行验证（图 2A、

2B)。之后使用Flag-FBXL6的质粒构建了过表达FBXL6的5637和T24细胞,同样使用WB和qRT-PCR进行验证(图2C、2D)。MTT实验显示,敲低FBXL6后膀胱癌5637和T24细胞的增殖能力显著下降(图2E),并在过表达FBXL6后,细胞增殖能力显著上升(图2F)。我们在平板克隆实验中观察到了同样趋势的结果(图2G、2H)。说明FBXL6的表达与膀胱癌的增殖能力密切相关。

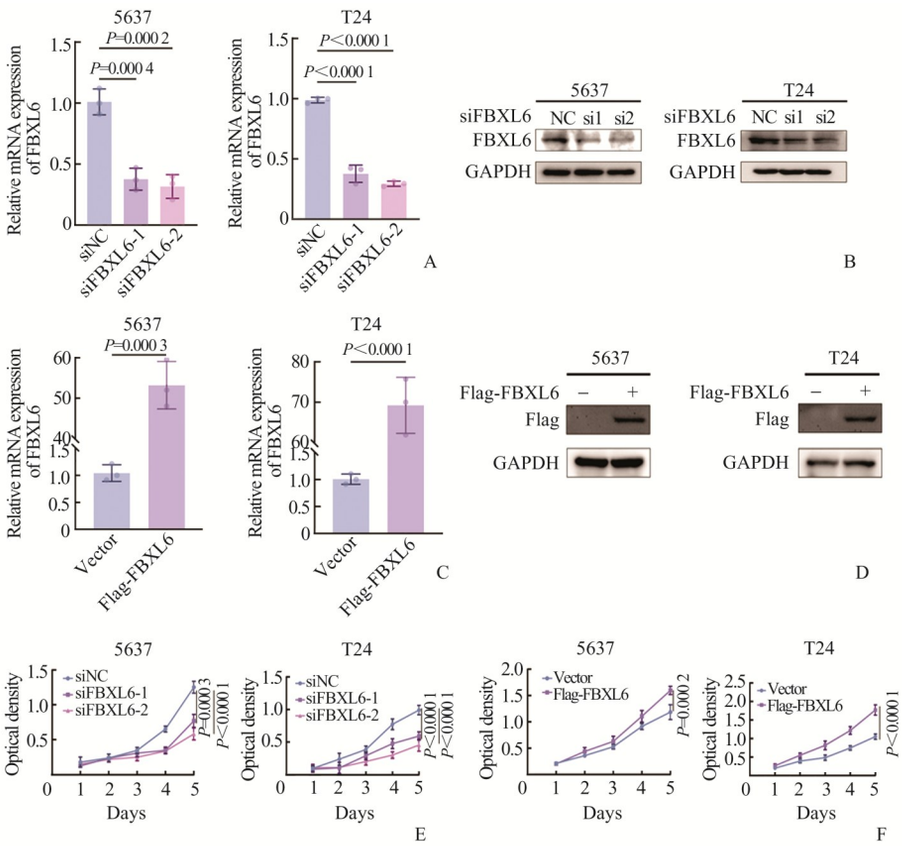


图2 FBXL6在体外影响膀胱癌细胞的增殖能力

A. qRT-PCR验证了5637和T24膀胱癌细胞在转染siFBXL6后FBXL6中mRNA的敲低。B. WB验证了5637和T24细胞中FBXL6的敲低。C. qRT-PCR验证了5637和T24膀胱癌细胞在转染Flag-FBXL6后FBXL6的mRNA水平。D. WB验证了5637和T24细胞中FBXL6的过表达。E. MTT实验检测5637和T24细胞中NC组和si组的增殖情况并进行了统计分析。F. MTT实验检测5637和T24细胞中Vector组和Flag-FBXL6组的增殖情况并进行了统计分析。

2.3 FBXL6在体外影响膀胱癌细胞迁移的能力 我们在5637和T24细胞中敲低以及过表达FBXL6后,通过Wound healing实验发现5637细胞系中敲低FBXL6组相较于NC组在经过24 h后,迁移的面积显著低于NC组。过表达FBXL6后,迁移的面积显著多于Vector组(图3A、3B),并在T24细胞中也证实了这一点(图3C、3D)。为了进一步验证,我们进行了Transwell实验,并发现穿过小室的细胞数量随着FBXL6的过表达而增加,敲低而减少(3E、3F)。这说明FBXL6的表达与膀胱癌细胞的迁移能力有关。

2.4 FBXL6调控TNF-α通路促进膀胱癌的发生和发展 我们在5637细胞中敲低FBXL6后,对NC组的5637细胞和敲低FBXL6组的5637细胞进行RNA-seq测序,发现主要与TNF-α、IL-17、cytokine-cytokine receptor通路相关(图4A)。在经过GSEA富集分析后,我们认为TNF-α通路最有可能是FBXL6所调控的通路(图4B)。为了进一步验证FBXL6对于TNF-α通路的调控的关系,我们选择WB实验从蛋白层面进行验证,选择下游关键蛋白p65及其磷酸化形式p-p65,评估FBXL6对TNF-α通路的激活作用。结果证明,在5637和T24细胞系中,随着FBXL6的表达降低,p65和p-p65都呈现明显的下降(图4C),说明FBXL6的下调会导致TNF-α通路的失活,这些结果证明了FBXL6对于TNF-α通路具有显著的调控关系。

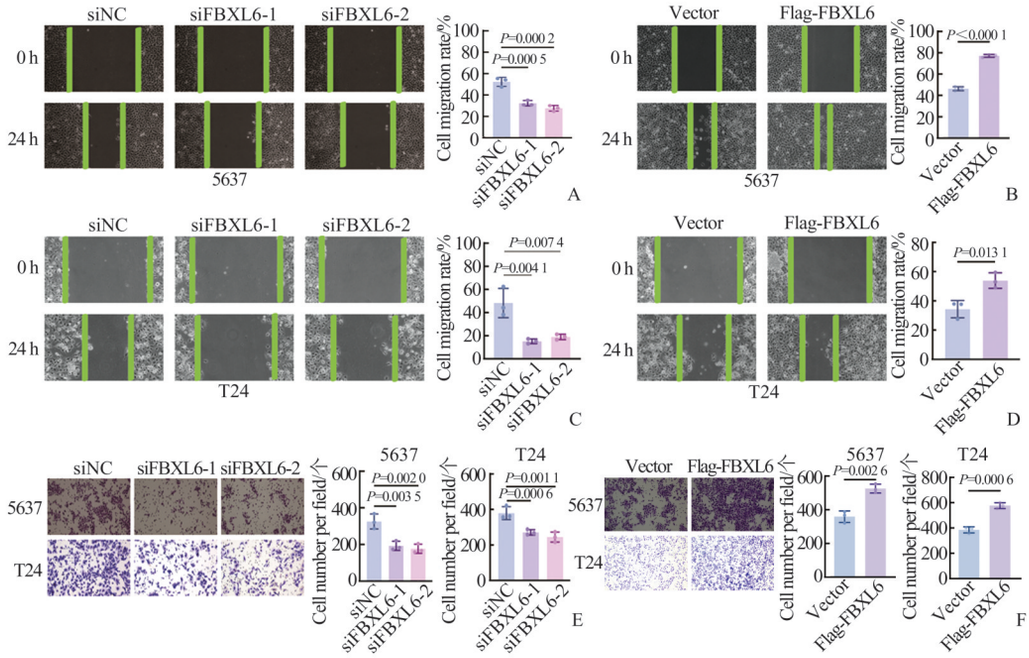


图 3　FBXL6 在体外影响膀胱癌细胞迁移的能力

A. 在 5637 细胞系中对三组（siNC、siFBXL6-1、siFBXL6-2）Wound healing 实验以及统计分析。B. 在 5637 细胞系中对二组（Vector 、Flag-FBXL6）Wound healing 实验以及统计分析。C. 在 T24 细胞系中对三组（siNC、siFBXL6-1、siFBXL6-2）Wound healing 实验以及统计分析。D. 在 T24 细胞系中对二组（Vector、Flag-FBXL6）Wound healing 实验以及统计分析。E. 在 5637 和 T24 细胞系中对三组（siNC、siFBXL6-1、siFBXL6-2）Transwell 实验以及统计分析。F. 在 5637 和 T24 细胞系中对二组（Vector 、Flag-FBXL6）Transwell 实验以及统计分析。

3　讨论

FBXL6（F-box and leucine-rich repeat protein 6）作为 F-box 蛋白家族的重要成员，主要参与泛素-蛋白酶体系统，介导特定蛋白质的降解[6]。在癌症生物学中，FBXL6 的功能不仅局限于其传统的蛋白降解作用，还涉及多个关键信号通路的调控[7]。近年来，FBXL6 在多种恶性肿瘤中的作用逐渐被揭示。例如，在卵巢癌中，FBXL6 通过促进细胞周期蛋白的稳定性，加速了细胞增殖[8]；在胃癌中，其高表达与上皮-间质转化（EMT）相关，显著增强了肿瘤细胞的侵袭能力[9]；在肝癌中，FBXL6 通过靶向降解抑癌蛋白 p53，激活了癌细胞的免疫逃逸机制[10-11]。这些研究提示，FBXL6 不仅是肿瘤发生和发展的关键驱动因子，还可能成为肿瘤治疗的重要靶点。

在膀胱癌中的研究中，我们通过 TCGA 数据库分析发现，FBXL6 在膀胱癌组织中的表达显著高于正常膀胱组织，并且与患者的不良预后密切相关。进一步的细胞实验表明，FBXL6 的高表达显著促进了膀胱癌细胞的增殖和迁移，而通过 siRNA 敲低 FBXL6 表达后，膀胱癌的增殖和迁移得到了显著抑制。这表明 FBXL6 可能在膀胱癌的发生和进展中发挥重要作用。

为了探索 FBXL6 调控膀胱癌的潜在机制，我们通过 RNA-seq 分析发现其下游信号通路可能集中于 TNF-α 信号通路。TNF-α 是一种多功能性细胞因子，具有复杂的双重作用：一方面，它可以通过诱导细胞凋亡抑制肿瘤的生长；另一方面，在慢性炎症或肿瘤微环境中，TNF-α 却通过激活 NF-κB 和 MAPK 等下游信号通路，促进肿瘤细胞的增殖、迁移及抗凋亡能力[12]。特别是在膀胱癌中，TNF-α 的高表达已被证明与肿瘤的侵袭性增强和治疗耐药密切相关[13]。

本研究结果提示，FBXL6 可通过增强 TNF-α 信号通路的活性，从而在膀胱癌细胞中发挥促癌作用。具体来说，TNF-α 信号通路的激活可能通过以下途径加速膀胱癌的进展：首先，它可以直接促进膀胱癌细胞的增殖和迁移，赋予癌细胞更强的侵袭性；其次，TNF-α 通过调控肿瘤微环境中的炎症细胞（如巨噬细胞、中性粒细胞和淋巴细胞），进一步促进了肿瘤的免疫逃逸[12]；此外，TNF-α 还能够通过上调血管生成相关因子（如 VEGF），增强肿瘤的血供，为肿瘤细胞提供生长所需的营养和氧气[12]。

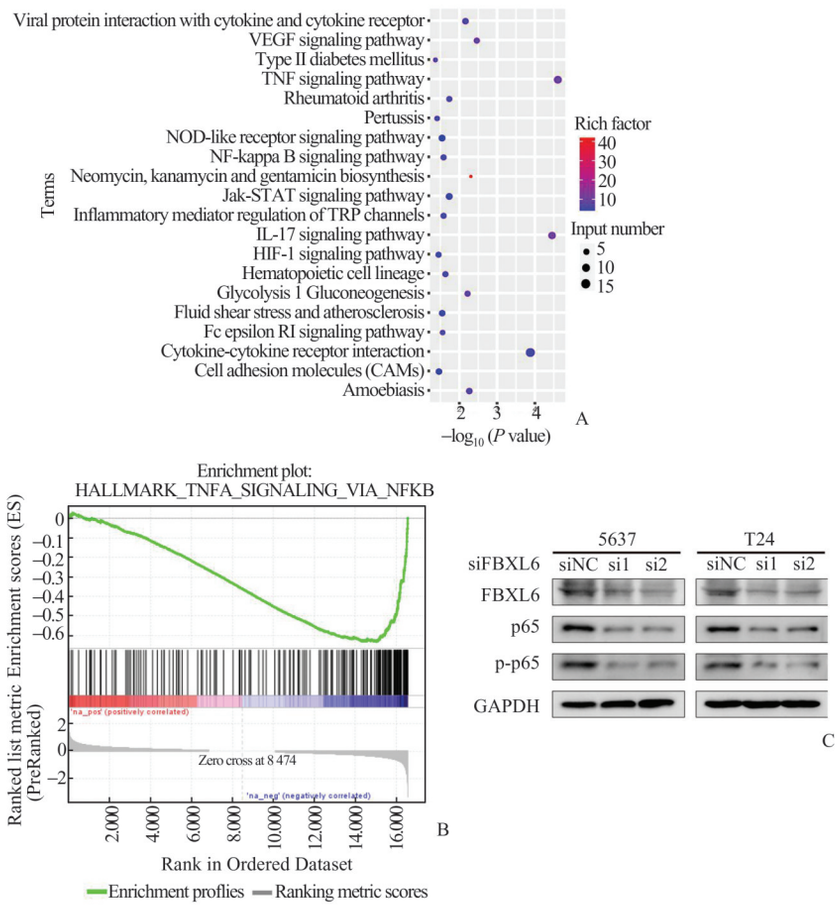


图4 FBXL6调控TNF-α通路促进膀胱癌的发生和发展

A. KEGG通路富集分析气泡图用于评估包含NC组和敲低FBXL6组的5637细胞的RNA-Seq数据。B. GSEA分析TNF-α通路所包含基因的富集情况。C. WB analysis通过蛋白层面验证FBXL6对于TNF-α通路的调控。

值得注意的是,TNF-α信号通路的复杂性也为膀胱癌治疗带来了挑战。尽管直接阻断TNF-α的策略在某些炎症性疾病(如类风湿性关节炎)中显示出显著疗效,但在肿瘤治疗中的应用仍存在潜在风险,因为TNF-α的完全抑制可能影响机体的免疫监视功能[14]。因此,针对FBXL6的靶向调控可能成为一个更加精准的治疗策略,通过间接调控TNF-α信号通路,在抑制膀胱癌进展的同时最大限度地减少副作用。

除了TNF-α信号通路,RNA-seq分析还显示,FBXL6可能与IL-17、细胞因子-受体相互作用等通路相关。这些通路在炎症调控和肿瘤微环境的塑造中也扮演了重要角色[15]。例如,IL-17通路的激活可能进一步增强TNF-α的促炎作用,形成一个正反馈回路,持续推动膀胱癌的进展。

综上所述,本研究首次系统性地揭示了FBXL6在膀胱癌中的关键作用,并阐明了其可能通过调控TNF-α信号通路来促进肿瘤细胞的增殖和迁移。我们的发现不仅为膀胱癌的分子机制研究提供了新的视角,也为靶向治疗提供了新的潜在靶点。未来的研究可以进一步探讨FBXL6与其他信号通路的相互作用,尤其是在肿瘤微环境中的作用机制。此外,通过开发特异性FBXL6抑制剂或基因编辑技术,评估其在膀胱癌治疗中的临床应用潜力,将成为一个重要的研究方向。我们期待这些研究能够为膀胱癌患者提供更加精准和有效的治疗方案。

参考文献

[1] COMPÉRAT E, AMIN M B, CATHOMAS R. Current best practice for bladder cancer: A narrative review of diagnostics and treatments [J]. Lancet, 2022 400 (10364): 1712-1721.

[2] MARTINS-LIMA C, CHIANESE U, BENEDETTI R. Tumor microenvironment and epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer: Cytokines in the game? [J]. Front Mol Biosci, 2022,9:1070383.

[3] TING H K, CHEN C L, MENG E. Inflammatory reg-

ulation by TNF-α-activated adipose-derived stem cells in the Human bladder cancer microenvironment [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(8): 3987.

[4] ZHANG J, LIN X T, YU H Q. Elevated FBXL6 expression in hepatocytes activates VRK2-transketolase-ROS-mTOR-mediated immune evasion and liver cancer metastasis in mice [J]. Exp Mol Med, 2023, 55(10): 2162-2176.

[5] TANG Z, KANG B, LI C. GEPIA2: An enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis [J]. Nucleic Acids Res, 2019, 47(W1): W556-W560.

[6] KIPREOS E T, PAGANO M. The F-box protein family [J]. Genome Biol, 2000, 1(5): Reviews3002.

[7] TEKCHAM D S, CHEN D, LIU Y. F-box proteins and cancer: An update from functional and regulatory mechanism to therapeutic clinical prospects [J]. Theranostics, 2020, 10(9): 4150-4167.

[8] TAO D, LOU S, HUANG W. Clinical and prognostic significance of FBXL6 expression in ovarian cancer [J]. Gene, 2025, 933: 148978.

[9] MENG L, HU Y T, XU A M. F-box and leucine-rich repeat 6 promotes gastric cancer progression via the promotion of epithelial-mesenchymal transition [J]. World J Gastrointest Oncol, 2023, 15(3): 490-503.

[10] LI Y, CUI K, ZHANG Q. FBXL6 degrades phosphorylated p53 to promote tumor growth [J]. Cell Death Differ, 2021, 28(7): 2112-2125.

[11] SHI W, FENG L, DONG S. FBXL6 governs c-MYC to promote hepatocellular carcinoma through ubiquitination and stabilization of HSP90AA1 [J]. Cell Commun Signal, 2020, 18(1): 100.

[12] BALKWILL F. TNF-alpha in promotion and progression of cancer [J]. Cancer Metastasis Rev, 2006, 25(3): 409-416.

[13] LI H, LIU S, LI C. TNF Family-based signature predicts prognosis, tumor microenvironment, and molecular subtypes in bladder carcinoma [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 9: 800967.

[14] WU Y, ZHOU B P. TNF-alpha/NF-kappaB/Snail pathway in cancer cell migration and invasion [J]. Br J Cancer, 2010, 102(4): 639-644.

[15] MCGEACHY M J, CUA D J, GAFFEN S L. The IL-17 family of cytokines in health and disease [J]. Immunity, 2019, 50(4): 892-906.

（2025-01-14 收稿）
编辑　孙孝云